



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるGlycosphingolipidsの機能解析 [全文の要約]
Author(s)	松原, 新史
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2410 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13031号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70870
Type	doctoral thesis
File Information	Shinji_Matsubara_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

軟骨細胞の力学的ストレス応答における Glycosphingolipids の機能解析
(Functional analysis of glycosphingolipids in response of chondrocytes under mechanical stress condition)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

松原 新史
Shinji Matsubara

学 位 論 文(要約)

軟骨細胞の力学的ストレス応答における Glycosphingolipids の機能解析
(Functional analysis of glycosphingolipids in response of chondrocytes under mechanical stress condition)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

松原 新史
Shinji Matsubara

【緒言】

変形性関節症（Osteoarthritis、以下 OA）は最も一般的な関節疾患であり、炎症とそれに付随する関節構造の変化が疼痛と運動機能低下を引き起こす。OA の病態は様々な要因が重なり合っているとされており、その中でも力学ストレスは関節変性を引き起こす最も重要な要因の 1 つである。

スフィンゴ糖脂質（Glycosphingolipids; 以下 GSLs）は脊椎動物の細胞膜に広く存在し、セラミドアンカーと共に細胞膜外葉に組み込まれている。ラフト構造を構成する脂質の性質が細胞膜の力学的性質に影響を及ぼすとする報告や GSLs が細胞骨格の 1 つである中間径フィラメントに影響を及ぼすとする報告より、細胞膜上に存在する GSLs が細胞骨格における構造変化を介して軟骨細胞の力学的性質に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。一方で GSLs は細胞内シグナルのトリガーとなる細胞膜上の受容体と相互に作用しており、ストレス応答の重要な調節因子であることが報告されている。我々は GSLs のノックアウトマウスを作成し、GSLs 欠損により加齢による OA 進行が助長されること、軟骨細胞の IL-1 α による MMP-13 の発現やアポトーシスが促進され OA 進行が助長されることを報告した。また GSLs 欠損により、過度な力学ストレスによる OA 進行がさらに助長されることを示し、力学ストレスによる OA 発症に GSLs が関与しているのではないかと考えた。

以上より、GSLs が軟骨細胞の力学的性質と力学ストレスに対する生理的応答を調節している、とする仮説を立て、GSLs 欠損マウス軟骨細胞を用いて力学的性質と力学ストレス応答を調査した。本研究の目的は軟骨細胞の力学的性質と力学ストレス応答における GSLs の機能的役割を明らかにすることである。

【実験方法】

GSLs 合成経路においてセラミドからグルコシルセラミドを合成する過程で作用するグルコシルセラミド合成酵素（Ugcg）の遺伝子を Cre/LoxP system を用い、軟骨特異的に欠損させたマウス（Col2-Ugcg^{-/-}マウス; Ugcg マウス）、そしてそのコントロールとして Loxp site を導入したマウス（Ugcg^{loxP/loxP} マウス; Flox マウス）を用いた。軟骨細胞は生後 5 日のマウス膝関節より先行研究で示した方法に準じて単離し、継代を行い実験に用いた。各マウス由来の軟骨細胞を 4 継代まで行い、初代、1 継代、4 継代した細胞に対して、アクチン染色により細胞骨格を、そして Micropipette Aspiration 法により細胞の弾性率（ヤング率）を評価した。また野生型マウス（Wild Type マウス; WT マウス）軟骨細胞をコラーゲンタイプ 1 ゲル内に包埋し、伸展負荷装置（ST-140）を用いて Cyclic Tensile Strain（頻度：1 Hz、強度：5%、10%、16%、時間：3 h、24 h）を負荷する三次元培養下力学負荷モデルを作成した。伸展負荷に伴う細胞変形を顕微鏡下に観察し縦横比で評価し、CTS 負荷後に Col2a1, Aggrecan, ADAMTS5, MMP13 の遺

伝子発現を評価した。次に本モデルを用いて Flox マウスと Ugcg マウス由来軟骨細胞に同じ条件の CTS を負荷し、同様に Col2a1, Aggrecan, ADAMTS5, MMP13 に関して遺伝子発現で評価した。また、力学ストレスに対する感度の違いを調べるために力学ストレスにより変化する細胞内 Ca イオン濃度を評価することにした。time lapse imaging を用いて、力学負荷後に Ca^{2+} oscillation (Ca シグナル) を評価した。

【実験結果】

アクチン染色による細胞骨格と軟骨細胞の弾性率 (ヤング率) の評価において、Flox 群と Ugcg 群の間で有意な差を認めなかった。WT マウス軟骨細胞を用いたモデル作成において細胞変形を表す縦横比は、0%と比較して 10%以上の伸張負荷により有意に増大した (10%; $P<0.0001$, 16%; $P<0.0001$)。また、遺伝子発現では、5%CTS 負荷により Col2a1 の発現が上昇し ($P=0.029$)、ADAMTS-5 と MMP-13 の発現が低下した ($P=0.045$, $P=0.016$)。一方、10%負荷により Col2a1、MMP-13 の発現が低下した ($P=0.012$, $P<0.001$)。さらに 16%負荷により Aggrecan の発現が低下し ($P=0.01$)、ADAMTS-5 と MMP-13 の発現が上昇した ($P=0.034$, $P=0.013$)。上記モデルを用いた Flox 群と Ugcg 群の遺伝子発現評価では、10%CTS 負荷において Ugcg 群で ADAMTS-5 と MMP13 の発現が有意に上昇した ($P=0.019$, $P=0.008$)。さらに、16%負荷において Ugcg 群で Col2a1 と Aggrecan の発現が減少する傾向を示した ($P=0.0765$, $P=0.057$)。また、Ca シグナル (Ca^{2+} oscillation) 評価では、10%以上の負荷において Ugcg 群で有意に増加した (10%; $P=0.005$, 16%; $P=0.006$)。

【考察】

GSLs 欠損マウス由来軟骨細胞における細胞膜および細胞骨格には明らかな力学特性の変化を認めなかった。本実験で作製した 3 次元培養下力学負荷モデルにおいて、5%CTS 条件では軟骨細胞に anabolic 効果を、16%CTS 条件では catabolic 効果を示した。一般的に、生体内において適度な力学ストレスは軟骨保護作用を、一方で過度な力学ストレスは軟骨変性作用を示すとされている。従って、我々の 3 次元培養モデルが anabolic 効果を示す適度な力学ストレス環境と catabolic 効果を示す過度な力学ストレス環境という 2 つの環境における軟骨細胞の応答性を評価できる、との結論に至った。静置培養環境において GSLs 欠損軟骨細胞は通常の軟骨細胞を比較して、遺伝子発現、そして Ca シグナルにおいて有意な差を認めなかった。一方、力学ストレス環境においては 10%、16% CTS 条件で、GSLs 欠損軟骨細胞群で catabolic factor が上昇し、anabolic factor が低下し、さらに Ca シグナル (Ca^{2+} oscillation) が増加した。この結果は、強度の高い力学ストレス応答において GSLs 欠損は Ca シグナルを介して軟骨変性作用を増強させることを示唆した。従って、GSLs 欠損は力学ストレス環境において Ca シグナ

ルを介して軟骨細胞の過度な応答を誘導し、この結果、OA の進行が助長されることが考えられた。言い換えると、細胞膜上に存在する GSLs は Ca シグナルを介して軟骨細胞の力学ストレス応答における catabolic な反応の制御を行っており、軟骨組織の恒常性を維持していると考えられた。

【総括および結論】

スフィンゴ糖脂質が Ca シグナルを介して軟骨細胞の過度な力学ストレスに対する生理的な応答を制御することに深く関わっていることが示唆された。このスフィンゴ糖脂質による制御機構は軟骨組織の恒常性維持に重要であると考えられ、スフィンゴ糖脂質が OA 治療における標的分子となり得ることを示している。今後は Ca シグナルを介した制御機構の詳細なメカニズムについてさらに研究を進めいきたいと考えている。